

| | |
|---------------|---|
| Title | Development of autoimmune diabetes in glutamic acid decarboxylase 65(GAD65)knockout NOD mice |
| Author(s) | 山本, 恒彦 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| oaire:version | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/46339 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 山 本 恒 彦 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 19698 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 17 年 4 月 28 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学 位 論 文 名 | Development of autoimmune diabetes in glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) knockout NOD mice (GAD65 ノックアウト NOD マウスにおける自己免疫性糖尿病の進展について) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 宮崎 純一 (副査) 教 授 荻原 俊男 教 授 下村伊一郎 |

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

1 型糖尿病は膵β細胞特異的自己免疫疾患であり、その発症過程において血清中に種々の膵島抗原に対する自己抗体が出現する。臨床的に 1A 型糖尿病の発症予知・診断マーカーとして用いられているが、これらが膵β細胞破壊の結果血液中に漏出した抗原に対して産生される一種のマーカーなのか、自己抗体自体が膵β細胞破壊をもたらす発症要因なのか一致した見解はない。我々は glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) ノックアウトマウスを作製し、1 型糖尿病発症モデルの NOD マウスにおいて、糖尿病発症に及ぼす影響を検討した。

〔 方法ならびに成績 〕

マウス GAD65 エクソン 1-6 を単離し、エクソン 2 フェニルアラニン残基直上にストップコドンを作成し、エクソン 3 の EcoRI-KpnI site に PGK-neomycin 耐性遺伝子カセットを挿入し、さらにセレクションのために 5' 側に DTA を結合させた。このターゲティングベクターを 129/Sv マウス由来 ES 細胞 E14-1 にエレクトロポレーションして、ターゲティングアリルを作成した。作成したノックアウト ES 細胞を C57BL/6J マウス由来胚盤胞に入れてキメラマウスを作り、これを NOD マウスと交配してファウンダーマウスを作成し、以後さらに NOD マウスと交配していった。遺伝的背景を 129/SvJ、C57BL/6J から NOD へ効率よく変換することを目的に、N4 世代と N5 世代において、Speed congenic の要領で、各染色体にマイクロサテライトマーカーを設定し、最も多くのマーカーで NOD マウスに置き換わっているものを選択した。これにより、N5 世代において、すべてのマーカーで NOD マウスに置き換わっているマウスを確認し、これをさらに 3 世代 NOD マウスと交配して N8 世代とし、その N8 世代同士での兄妹交配により GAD65 蛋白発現を欠失するノックアウト NOD マウスを作製した。

これにより、雌性の Homo 群 (n=31)・Hetero 群 (n=62)・WT 群 (n=23) を得た。ノーサンブロット・ウェスタンブロット法により、GAD65 変異を確認した。ノーザンブロットでは、約 2 kb の全長 mRNA を鋳型としたプローブを使用し、ウェスタンブロットでは、GAD65 の C 端側を特異的に認識するモノクローナル抗体 (GAD6) を使用した。それぞれ mRNA、蛋白は脳より抽出しており、WT 群、Hetero 群、Homo 群の順に mRNA・蛋白レベルで GAD65 発現が下がっており、ホモでは消失していることを確認した。

それぞれ外見上全く違いはないが、Homo 群では5週齢目頃より成長障害が見られる。また、15週齢目頃より軽微の刺激で、てんかん発作が出現し始める。そのためかどうかは不明であるが、20週齢目頃より糖尿病の発症とは無関係に突然死するマウスが31匹中7匹出現した。得られた雌性のNODマウスにおける糖尿病自然累積発症率をKaplan-Meier法にて検討した。30週にてHomo群41.5%・Hetero群52.7%・WT群55.4%と、3群間に有意な差を認めなかった(Logrank test $p=0.71$)。組織学的検討では、12週齢の非糖尿病発症群において膵島形成に異常はなく、Homo群にてもHetero群・WT群と同様にすでに膵島周囲炎の状態を呈していた。糖尿病発症後の20週齢においては、いずれの群でも顕著な膵島炎の状態を呈していた。また、cyclophosphamide腹腔内投与(200 mg/kg)による糖尿病発症促進実験においては、Homo群においても糖尿病発症抑制は認めず、3群間に有意な差を認めなかった。

[総 括]

NODマウスでは、これまでの報告により、自己抗原の中では最も早期からGAD65・67が発現しており、特にGAD65に対する自己反応性が顕著に出現している。しかし、今回の検討から、自己抗原GAD65の発現は、NODマウスにおける自己免疫性1型糖尿病の発症には直接関与しないことが示された。今回の検討から、自己抗原GAD65の発現は、NODマウスにおける自己免疫性1型糖尿病の発症には直接関与しないことが示された。

論文審査の結果の要旨

1型糖尿病における自己抗原がその発症においていかなる役割を果たしているのか一致した見解はない。その機序を解明することを目的として、自己抗原の一つであるGAD65 (glutamic acid decarboxylase 65) のノックアウトマウスを作製し、NODマウスの糖尿病発症における影響を検討した。GAD65遺伝子 exon3 にPGK-neomycin 耐性遺伝子を挿入し、ノックアウトマウスを作製した。雌性NODマウスにおける糖尿病累積発症率を検討したところ、Homo群・Hetero群・WT群の3群に有意差を認めなかった。組織学的検討では、膵島形成に異常なく、Homo群にてもHetero群・WT群と同様に顕著な膵島炎を呈していた。GAD65の発現は、NODマウスにおける自己免疫性1型糖尿病の発症に大きく関与しないことが示された。以上の研究結果はGADの臨床的意義を考える上で示唆にとむものであり、学位の授与に値するものと考えられる。